

THESIS

WÜRZBURG

1967

Aus dem Physiologischen Institut
der Universität Würzburg
Vorstand: Professor Dr.E.Bauereisen

IONENTRANSPORTE IM GEREIZTEN RATTENZWERCHFELL

I N A U G U R A L - D I S S E R T A T I O N

verfaßt und der
Hohen Medizinischen Fakultät
der
Julius-Maximilians-Universität Würzburg
zur
Erlangung der medizinischen Doktorwürde

vorgelegt von
Peter Limbourg
aus Würzburg

Würzburg 1967

LANE MEDICAL LIBRARY OF
STANFORD UNIVERSITY
300 PASTEUR
PALO ALTO, CALIFORNIA

Aus dem Physiologischen Institut
der Universität Würzburg
Vorstand: Professor Dr.E.Bauereisen

IONENTRANSPORTE IM GEREIZTEN RATTENZWERCHFELL

I N A U G U R A L - D I S S E R T A T I O N

verfaßt und der
Hohen Medizinischen Fakultät
der
Julius-Maximilians-Universität Würzburg
zur
Erlangung der medizinischen Doktorwürde

vorgelegt von
Peter Limbourg
aus Würzburg

Würzburg 1967

Referent: Privatdozent Dr.W. Westphal

Korreferent: Professor Dr.E. Bauereisen

Tag der Promotion: 13. 6. 67

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität Würzburg



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA40153518_0071

I N H A L T S V E R Z E I C H N I S

	Seite
I. <u>Einleitung</u>	1
Abkürzungen und Symbole	5
II. <u>Fragestellung</u>	7
III. <u>Methodik</u>	10
1. Versuchstiere und Fütterung	10
2. Anästhesie und Präparation	10
3. Inkubationsmedium, Versuchsbedingungen und Reizparameter	11
4. Gewinnung der Gewebeproben	12
5. Bestimmung des Wassergehaltes	13
6. Bestimmung des Natrium- und Kaliumgehaltes .	13
7. Bestimmung des Gewebeschlorids	14
8. Inulinbestimmung, Inulinverteilung und Inulinraum	14
9. Berechnung der intracellulären Ionenkonzentrationen	17
10. Berechnung der Faseroberfläche	18
11. Statistische Verfahren und Symbole	19
IV. <u>Ergebnisse</u>	20
1. Das Verhalten von Natrium, Kalium und Chlorid im isolierten, nicht erregten Zerchfell	20
2. Veränderungen der Ionenkonzentrationen während Reizung mit verschiedenen Frequenzen	21
3. Korrelation der Innenkonzentrationen von Natrium, Kalium und Chlorid	21
4. Nettoverschiebungen der Elektrolyte	24
5. Reizfrequenz und aktive Kationentransporte .	25

6. Der Einfluß der Innenkonzentrationen von Natrium und Kalium sowie der Reiz- frequenz auf den Natriumnettotransport . . .	27
7. Die quantitative Abhängigkeit des aktiven Natriumtransportes vom elektro-chemischen Potential	31
V. <u>Diskussion</u>	36
1. Das isolierte, inaktive Diaphragma	36
2. Das isolierte, erregte Diaphragma	37
3. Aktiver Ionentransport und elektro- chemisches Potential	40
VI. <u>Zusammenfassung</u>	43
Literaturverzeichnis	I-VII

I. E I N L E I T U N G

Im Jahre 1902 erkannte Overton die Bedeutung der Natriumionen für die Erregbarkeit des Muskels. 50 Jahre später stellten A.L.HODGKIN und A.F.HUXLEY (1952) die Ionentheorie der Erregung auf. Diese Theorie ermöglicht eine quantitative Beschreibung des Erregungsvorganges an der Zellmembran.

Übertragen auf die quergestreifte Muskulatur und damit auch auf unser Versuchsobjekt, das isolierte Zwerchfell der Ratte, bestehen ihre wesentlichen Aussagen in folgenden Punkten:

1. Die Muskelfasern sind von einer für Ionen selektiv permeablen Membran umgeben.
2. In der Zelle liegen Kaliumionen in hoher, Natriumionen aber in niedriger Konzentration vor; in der die Faser umgebenden interstitiellen Flüssigkeit verteilen sie sich in umgekehrtem Verhältnis.
3. Im Zustand der Ruhe ist die Membran für K^+ besser durchlässig als für Na^+ , das Zellinnere verhält sich gegenüber seiner Umgebung elektrisch negativ (Membranruhepotential).
4. Als Folge und Ausdruck der Erregung nimmt die Natriumpermeabilität der Zellwand stark zu, Na^+ strömen in der Richtung ihres elektrischen und chemischen Gradienten in die Zelle ein; physikalischer Ausdruck dieser Ionenbewegung ist die Umladung der Membrankapazität, das Zellinnere kann positiv gegenüber seiner Umgebung werden (Aktionspotential).

5. Die Natriumdurchlässigkeit der Membran wird reduziert und die für K^+ erhöht; der Natriumeinstrom wird von einem Kaliumausstrom abgelöst, und das Membranruhepotential wird wiederhergestellt.
6. Die notwendigen Konzentrationsgradienten für Natrium- und Kaliumionen werden durch Transportmechanismen aufrechterhalten, die Energie aus dem Stoffwechsel der Zelle verwenden.

Diese Feststellungen enthalten keinen Hinweis auf die Natur der Veränderungen, die sich im molekularen Bereich in der Zellmembran abspielen und die Permeabilitätsänderungen ermöglichen. Ebenso wenig gestatten sie eine Aussage über Charakter und Funktionsweise der Ionen aktiv transportierenden Mechanismen, die unter Verbrauch von Stoffwechselenergie die Restitution der ursprünglichen Ionenverteilung an der Membran mit Hilfe von hypothetischen "Trägern" (carriers) (HODGKIN und KEYNES, 1955) ermöglichen. Allerdings besteht bis heute noch keine Klarheit über die physikalisch-chemischen Modelle, die solchen Transportmechanismen zugrunde liegen könnten (NETTER, 1961).

Die Elektrolytkonzentrationen in Muskelfasern sind keine konstanten Größen; sie können sich je nach Versuchsobjekt und -bedingungen ändern. Das haben schon die Experimente von FENN und COBB (1934) am Froschmuskel gezeigt. Die von ihnen gefundene Kaliumabgabe und Natriumaufnahme des isolierten Gewebes sind in der Zwischenzeit an verschiedenen Präparaten nachgewiesen worden.

Solche typischen Veränderungen des Kationengehaltes, nämlich die Verminderung der intracellulären Kalium- und Zunahme der intracellulären Natriumkonzentration, die bei isolierten Muskeln, welche in äquilibrierten Salzlösungen aufbewahrt werden, in Abhängigkeit von der Dauer der Inkubation und der Versuchstemperatur auftreten, haben unter anderem BORN und

BÜLBRING (1956) an glatten Muskelfasern, PAGE, GOERKE und STORM (1964) am Myocard, sowie CONWAY, HARRINGTON und MULLANEY (1963) an der quergestreiften Skelettmuskulatur gefunden.

In allen diesen Fällen handelt es sich um Ionenverschiebungen, die thermodynamisch freiwillig erfolgen und eine Abnahme der freien Energie der Zelle bewirken.

Isolierte Rattenzwerchfelle zeigen in gleicher Weise die beschriebenen Variationen im Ionengehalt, wenn sie ungereizt in Salzlösungen verschiedener Zusammensetzung über längere Zeit inkubiert werden. Eine tabellarische Zusammenstellung der Zunahme des Natriumgehaltes von Diaphragmen gegenüber ihren Ausgangswerten, wie sie von verschiedenen Untersuchungsgruppen gefunden wurde, geben CREESE und NORTHOVER (1961).

Die Zunahme des Natrium- und die Abnahme des Kaliumgehaltes sind unter folgenden experimentellen Bedingungen wenigstens teilweise reversibel:

1. Erhöhung der Kaliumkonzentration (STEINBACH, 1940) und zusätzliche Erniedrigung des Natriumgehaltes in der Außenlösung (CAREY, CONWAY und KERNAN, 1959).
2. Zugabe von Insulin bei gleichzeitigem Angebot von energielieferndem Substrat (FLÜCKIGER und VERZÁR, 1954; KERNAN, 1961; GOURLEY, 1965).

Der Effekt dieser beiden Verfahren kann auch am isolierten Zwerchfell der Ratte nachgewiesen werden (CONWAY, KERNAN und ZADUNAIKY, 1961; CREESE, 1964).

Für dieses Präparat existiert eine dritte Möglichkeit, die während der Inkubation in Ruhe aufgetretene Natrium-

zunahme und Kaliumabgabe teilweise wieder rückgängig zu machen. Sie besteht in der niederfrequenten Reizung (bis zu 12 Impulsen/min) der Muskelstreifen (WESTPHAL, 1958; 1961).

Bei dem durch die Stimulation induzierten Natriumausstrom handelt es sich nach der Definition von USSING (1961) dann um einen aktiven Ionentransport, wenn folgende Bedingungen erfüllt sind:

1. Der Transport muß entgegen dem elektrochemischen Gradienten erfolgen,
2. das zwischen Influx und Efflux ermittelte Verhältnis (Flux-Relation) darf nicht auf der Grundlage meßbarer physikalischer Kräfte erklärbar sein,
3. die für den Transport der Ionen benötigte Energie muß aus dem Stoffwechsel der Zelle stammen.

Im isolierten Diaphragma gehorchen sowohl die Natriumabgabe als auch die Kaliumaufnahme diesen drei Forderungen (WESTPHAL, 1966).

Abkürzungen und Symbole.

R	universelle Gaskonstante	(1,987 cal/Mol·grd)
F	FARADAY'sche Ladungszahl	(96 500 A sec/Äq)
T	absolute Temperatur	(grd K)
E _m	Membranruhepotential	(mV)
E _K	Kaliumgleichgewichts- potential	(mV)
ln	natürlicher Logarithmus	
log	dekadischer Logarithmus	
e	Basis der natürlichen Logarithmen	
kg _f	Kilogramm feuchten Gewebes	
ECR	Extracellulärraum	(ml/kg _f)
FG	Feuchtigkeitsgehalt	(ml/kg _f)
k	Geschwindigkeitskonstante des Austausches	(h ⁻¹)
Na _E	der durch die Reizung bedingte passive Natrium- einstrom.	(mM/kg _f · min)
Na _T	Rate des Natriumauswärts- transportes	(mM/kg _f · min)
ATP	Adenosintriphosphat	
ATPase	Adenosintriphosphatase	

$\text{Na}_i, \text{K}_i, \text{Cl}_i$	intracelluläre Konzentrationen von Natrium, Kalium und Chlorid	(mM/l)
$\text{Na}_a, \text{K}_a, \text{Cl}_a$	extracelluläre Konzentration von Natrium, Kalium und Chlorid	(mM/l)
$\text{Na}_{120}, \text{Na}_{180}$	Natriumgehalt nach 120 bzw. 180 Minuten Inkubation in Ruhe	(mM/kg _f)
$\text{Na}_{90+30}, \text{Na}_{90+90}$	Natriumgehalt von Zwerchfellen, die nach 90 Minuten Inkubation in Ruhe weitere 30 bzw. 90 Minuten gereizt wurden.	(mM/kg _f)

II. FRAGESTELLUNG

Das Ziel der vorgelegten Arbeit besteht darin, das Ausmaß der durch Reizung ausgelösten aktiven Kationen-transporte am isolierten Zwerchfell der Ratte bei Anwendung höherer Reizfrequenzen systematisch zu untersuchen.

Jede fortgeleitete Erregung bewirkt an der Muskelfaser einen passiven Natrium-Influx (HODGKIN und HOROWICZ, 1959) und einen äquivalenten, passiven Kalium-Efflux (CREESE, 1954). Die Mengen von aufgenommenem Natrium und abgegebenem Kalium sind dabei eine Funktion der Reizfrequenz, mit der sie größer werden. Es ist zu erwarten, daß besonders bei schneller Impulsfolge diese passiven Ionenverschiebungen den Natrium- und Kaliumgehalt des Muskels entscheidend bestimmen, und daß die aktiven Transporte von ihnen überlagert werden.

Beim aktiven Ionentransport wird Energie aus dem Zellstoffwechsel dazu verwendet, Ladungsträger von einem energetisch niedrigen auf ein höheres Niveau zu heben. Dabei wird entweder Arbeit gegen ein Konzentrationsgefälle (osmotische Arbeit) oder gegen die Kräfte des elektrischen Feldes an der Membran geleistet. Die Addition dieser beiden Kräfte ergibt das elektro-chemische Potential des geladenen Teilchens.

Kaliumionen liegen innerhalb der Muskelfaser in höherer Konzentration vor als in deren Umgebung. Der Kaliumausstrom entlang dem osmotischen Gradienten wird aber durch die negative Ladung des Zellinneren (Membranruhepotential) we-

sentlich verzögert. Die osmotischen und elektrischen Kräfte, die auf dieses Ion wirken, sind einander entgegengesetzt gerichtet und heben sich fast auf. Die Differenz im elektro-chemischen Potential zwischen extra- und intracellulär gelegenen Kaliumionen ist gering, sie befinden sich in der Nähe des elektro-chemischen Gleichgewichtes. Aus diesem Grunde erfolgt der Kaliumtransport unter quantitativ verhältnismäßig geringfügigen Energieumwandlungen.

Im Gegensatz zu Kalium wirken Konzentrationsdifferenz und elektrisches Feld auf die Natriumionen synergistisch. Natriumionen sind in der interstitiellen Flüssigkeit in höherer Konzentration vorhanden als im Faserwasser, ihr osmotischer Gradient fällt nach innen ab. In der gleichen Richtung wirkt die Negativität des Membranruhepotentials auf dieses Kation. Der Wert des elektro-chemischen Potentials von extracellulärem Natrium ist eindeutig größer als der von intracellulärem Natriumionen strömen also thermodynamisch freiwillig in die Zelle ein. Demgegenüber muß beim Natriumauswärtstransport Arbeit geleistet werden. Die freie Energie, die dafür benötigt wird, setzt sich aus zwei Anteilen zusammen, von denen einer zur Überwindung des Konzentrationsgradienten, der andere für die Bewegung der positiv geladenen Teilchen entgegen den Kräften des elektrischen Feldes erforderlich ist. Um ein Mol Natrium aus dem Faserinneren zu eliminieren, bedarf es eines Energieaufwandes, der sich wie folgt berechnen läßt:

$$\frac{dG}{dn} = RT \ln \frac{Na_a}{Na_i} + E_m \cdot F \text{ (cal/mÄq)} \quad \begin{matrix} \text{(NETTER, 1959;} \\ \text{KLOTZ, 1960)}. \end{matrix}$$

Ersetzt man in dieser Gleichung in einer Vereinfachung das Membranruhepotential E_m durch den Wert des Kaliumgleichgewichtspotentials E_K , das aus der NERNST'schen Beziehung

hervorgeht:

$$E_K = \frac{RT}{F} \ln \frac{K_i}{K_a} \text{ (mV)}, \text{ so erh\u00e4lt sie die Form:}$$

$$\frac{dG}{dn} = RT \ln \frac{Na_a}{Na_i} + RT \ln \frac{K_i}{K_a} \text{ (cal/m\u00c5q)}.$$

Aus dieser Formel geht hervor, da\u00df eine Verminderung der f\u00fcr den Natriumtransport aufzuwendenden Energie dann zu erwarten ist, wenn entweder die Natriumkonzentration im Inkubationsmedium reduziert oder die Kaliumkonzentration erh\u00f6ht wird. Dieses Verfahren haben STEINBACH (1940) und CONWAY (1960) angewandt, um den aktiven Transport von Natriumionen in inkubierten, ruhenden Froschmuskeln zu intensivieren.

Mit dem gleichen Effekt ist zu rechnen, wenn die Muskelzellen im Verlaufe der Inkubation Natrium aufnehmen und Kalium verlieren.

Aus den angef\u00fchrten Gr\u00fcnden liegt die Vermutung nahe, da\u00df der Ionengehalt des gereizten Zwerchfells von mehreren Faktoren determiniert wird. Hierher geh\u00f6ren in erster Linie die Wirkung der Reizfrequenz und -dauer, der Einflu\u00df des elektrochemischen Potentials, gegen das Natriumionen bewegt werden m\u00fcssen, und die Intensit\u00e4t der induzierten, aktiven Ionentransporte. Die Bedeutung dieser Variablen mu\u00df einer eingehenden Analyse unterzogen werden.

III. M E T H O D I K

1. Versuchstiere und Fütterung.

Als Versuchstiere dienten Albinoratten beiderlei Geschlechts, die mit dem Standardfutter ALTROMIN R ernährt worden waren. Sie wogen zum Zeitpunkt der Versuche etwa 180 Gramm.

2. Anästhesie und Präparation.

Die Gewinnung des Zwerchfell - Phrenicus - Präparates geschah nach den Angaben von BÜLBRING (1946). Dazu wurden die Tiere in einen länglichen Metallkasten gebracht, dessen Querwände aus Plexiglas waren. Unter der Decke des Gehäuses lag auf einem groben Metallgitter ein Wattebausch, auf den von oben durch einen Trichter "Äther pro narcosi" tropfte.

Nach Eintritt der Narkose wurden die Tiere gewogen und aus der freigelegten A. carotis entblutet. Die Eröffnung von Abdomen und Thorax der Tiere schloss sich unmittelbar an. Das so exponierte Diaphragma wurde in der Mitte längs durchteilt und die beiden gewonnenen Zwerchfelhälfen mit den als Ansatz dienenden Rippen und dem schonend präparierten linken N. phrenicus herausgenommen. Den Diaphragmahälften anhaftendes Blut wurde durch Eintauchen in angewärmte, oxygenierte saline Lösung abgespült. Es folgte die sofortige Aufhängung beider Präparate an einem isotonischen Hebel, der es erlaubte, die Kontraktionen des mit 10 Gramm Belastung ausgespannten Versuchsobjektes auf einem Rußkymographion zu registrieren.

Es wurde darauf geachtet, die Zeit vom Beginn der Präparation bis zum Eintauchen der Muskelstreifen in die Spülflüs-

sigkeit möglichst kurz zu halten.

3. Inkubationsmedium, Versuchsbedingungen und Reizparameter.

Als Inkubationsmedium diente die von KREBS und HENSELEIT (1932) angegebene Lösung mit Bicarbonat (KREBS-Lösung).

Tabelle 1 zeigt die Zusammensetzung dieser Lösung im Vergleich zu der von Rattenserum (DITTMER, 1961).

	KREBS- Lösung	Ratten- serum
Na ⁺	142,4	141,4
K ⁺	5,94	5,1
Ca ⁺⁺	5,08	4,4
Mg ⁺⁺	2,38	1,3
Summe:	155,8	152,2
Cl ⁻	127,8	113,5
SO ₄ ⁻⁻	2,4	3,0
H ₂ PO ₄ ⁻	1,2	7,0
HCO ₃ ⁻	24,4	20,9
Summe:	155,8	144,3
Wasser		946 g/l
Glucose	200,0	136,6 mg/100 ml
pH	7,3-7,5	7,3-7,5 (Blut)

Tabelle 1:

Zusammensetzung von KREBS-Lösung im Vergleich zum Serum der Ratte. (Angaben der Ionenkonzentrationen in mÄq/l).

Die Gefäße, welche die ganze Versuchsanordnung (Nerv-Muskel-Präparat, Gaszufuhr, Reizelektroden) aufnahmen, faßten ca. 60 ml Inkubationsflüssigkeit. Die Hemidiaphragmen konnten also in toto eintauchen. Ein Wasserbad garantierte eine konstante Versuchstemperatur von 38° C. Die KREBS-Lösung

wurde von einem Gasgemisch aus 95% O_2 und 5% CO_2 (Carbogen) lebhaft und feinblasig durchperlt.

Für die linke Zwerchfellhälfte begann nach 90 Minuten Inkubation in Ruhe die indirekte Reizung mit Frequenzen von 12,5; 25; 50; 100 und 200 Impulsen pro Minute. Dazu wurden supramaximale Stromstöße von einem Rechteckreizgerät mit einer Dauer von 0,5 msec verwendet. Sie erreichten den feucht gehaltenen N. phrenicus über zwei Platinelektroden (indirekte Reizung) von je 0,5 mm Durchmesser und 3 mm Abstand voneinander. Dabei lag die Kathode distal. Die rechte Zwerchfellhälfte diente als ungereizte Kontrolle.

4. Gewinnung der Gewebeproben.

Die Entnahme von Gewebeproben geschah nach folgendem Zeitplan: Zum Zeitpunkt Null (0) wurde aus dem frisch präparierten Zwerchfell ein Muskelstreifen aus der Pars lumbalis des Objektes entnommen. Der Gehalt an Elektrolyten dieses Teiles unterschied sich nicht signifikant von ihrer Konzentration in anderen Diaphragmaabschnitten und wurde zur Bestimmung des Ausgangswertes benutzt.

Nach dem Eintauchen in die Salzlösung blieben beide Präparate 90 Minuten lang ungereizt. Nach dieser Zeit lieferte das rechte Zwerchfell eine Probe (90), und für das linke begann die indirekte Reizung. Im Folgenden wurden aus dem rechten Zwerchfell nach weiteren 30 und 90 Minuten (120, 180) Gewebsteile entnommen. In gleicher Weise wurde mit dem gereizten linken Hemidiaphragma verfahren (90+30, 90+90). Es wurde dabei darauf geachtet, daß die Schnittführung parallel zur Längsachse der Fasern verlief, um möglichst wenig Muskelzellen zu verletzen. Fett und sehnige Anteile, die dem ca. 50-100 mg schweren Gewebstreifen anhängen, wurden entfernt und die Muskulatur mit der konvexen Seite einer gebogenen Pinzette auf Filterpapier

(SCHLEICHER & SCHÜLL, Nr. 595) nach einem standardisierten Verfahren mäßig fest und zügig ausgestrichen.

In die Auswertung der Ergebnisse wurden nur Präparate einbezogen, die ihre Kontraktilität während der ganzen Versuchsdauer behalten hatten.

5. Bestimmung des Wassergehaltes.

Die Proben wurden in vorgewogenen Reagenzgläsern aus SUPREMAX-Glas (SCHOTT u. GEN, Mainz) 12-16 Stunden lang bei $106 \pm 2^{\circ} \text{C}$ im Trockenschrank bis zur Gewichtskonstanz getrocknet. Die Ermittlung des Feucht- und Trockengewichtes geschah mit einer Waage, deren Genauigkeit $\pm 0,1 \text{ mg}$ betrug (Modell MONOPAN, Aug. SAUTTER, Ebingen).

Der Fehler der Doppelbestimmung betrug für 80 Hemidiaphragmen $\pm 7,6 \text{ ml H}_2\text{O/kg}_f$.

6. Bestimmung des Natrium- und Kaliumgehaltes.

Die getrockneten Proben wurden mit 10 ml $0,1 \text{ N HNO}_3$ 24-28 Stunden lang bei Zimmertemperatur extrahiert. Die Bestimmung der Kationen in den sauren Lösungen geschah flammenphotometrisch mit dem Gerät EPPENDORF (NETHELER und HINZ, Hamburg), welches vorher mit ansteigenden Konzentrationen von 0 bis 2 mM NaCl/l und absteigenden von 2 bis 0 mM KCl/l $0,1 \text{ N HNO}_3$ - in Sprüngen von $0,4 \text{ mM/l}$ - geeicht worden war. Bei diesen Messungen blieben der Luftdruck ($0,5 \text{ kg/cm}^2$), der Propandruck ($240 \text{ mm H}_2\text{O}$) und die Ansaughöhe (10 cm) konstant.

80 Doppelbestimmungen ergaben an der gleichen Zwerchfelloberfläche für Kalium einen Fehler von $\pm 4,2$ und für Natrium einen von $\pm 4,9 \text{ mM/kg}$ Feuchtgewicht.

7. Bestimmung des Gewebeschlorids.

Die vorbereitende Behandlung der Präparate entsprach der zur Ermittlung des Kationengehaltes und wurde, wie auch die folgende Prozedur, gemäß den Angaben von WHITTAM (1955) und LAMB (1961) durchgeführt: Extraktion der getrockneten Proben in 10 ml 0,1 N HNO_3 und Stehenlassen bei Raumtemperatur über Nacht. Es folgte die Auffüllung eines aliquoten Anteiles (0,5-1,0 ml) mit 20 ml Aceton und die amperometrische Bestimmung des Gewebeschlorids (PARKS und LYKKEN, 1950; STIER, 1963) mittels Titration gegen AgNO_3 .

Der Fehler der Doppelbestimmung betrug bei 20 Messungen $\pm 5,2$ mM Chlorid/kg_F.

8. Inulinbestimmung, Inulinverteilung und Inulinraum.

Inulinbestimmung: Die Inulinbestimmung erfolgte entsprechend dem Vorgehen von WAHLER (1956). Voraussetzung für reproduzierbare Ergebnisse sind die Verwendung alkalistabilen Inulins und frisch vakuumdestillierten Rescorcins. Das Verfahren nutzt die IHL'sche Resorcin-Farbreaktion auf Fructose nach vorausgegangener alkalischer Autooxydation störender Oligosaccharide und saurer Hydrolyse des alkalistabilen Inulins aus. Die entwickelte Farbe muß innerhalb von 30 Minuten bei einer Wellenlänge von 515 nm kolorimetriert werden. Dazu wurde ein Spektrophotometer (UNICAM-Instruments, Cambridge/Engl.) verwendet.

Im isolierten, inkubierten Zwerchfell der Ratte eventuell gebildete Fructose konnte als Fehlerquelle ausgeschlossen werden.

Die Messung von Gewebsblankwerten (Inuloid) zur Korrektur der erhaltenen Ergebnisse war unbedingt erforderlich.

Alle Bestimmungen erfolgten mit Substanzen von p.a.-Qualität, Aceton und Inulinum waren purissimum.

Inulinverteilung: Die Verteilung von Inulin in dem interstitiellen Gewebsanteil erfolgt nach einfachen Diffusionsgesetzen. Sie ist somit vom Diffusionskoeffizienten und der Inulinkonzentration im Inkubationsmedium abhängig. Nimmt man an, daß die Inulinkonzentration im extracellulären Raum sich der in der Außenflüssigkeit vollständig angleicht, so errechnet sich der Inulinverteilungsraum nach dem Ansatz:

$$\frac{\text{mg Inulin/kg}_f \text{ Gewebe}}{\text{mg Inulin/ml Lösung}} \quad (\text{ml/kg}_f)$$

Inulinraum: Abbildung 1 zeigt den Verlauf der Inulindiffusion aus der Badeflüssigkeit (0,5% Inulin-KREBS-Lösung) in das Gewebe in Abhängigkeit von der Dauer der Inkubation.

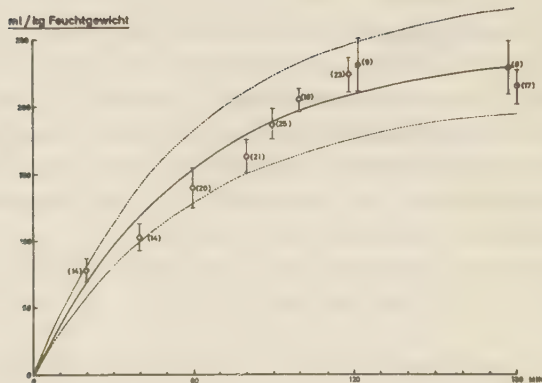


Abbildung 1: Der Verlauf der Inulindiffusion bei 38°C in Abhängigkeit von Zeit und Erregung. (o = ungereizte Präparate, ● = Präparate, die nach 90 Minuten Inkubation in Ruhe über weitere 30 bzw. 90 Minuten mit einer Frequenz von 12/min gereizt wurden; $\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$, N in Klammern).

Die Kurve der Mittelwerte für den Inulinverteilungsraum verlief in dieser Abbildung entsprechend einer Exponentialfunktion:

$$y = y_0 (1 - e^{-kt})$$

Die statistische Auswertung der Ergebnisse erbrachte für den Endwert des Inulinraumes:

$$y = 239 (1 - e^{-1,016 \cdot h}) \text{ (ml/kg}_f\text{)},$$

also 239 ml/kg Feuchtgewicht. Die Geschwindigkeitskonstante k von $1,016 \cdot h^{-1}$ ist identisch mit einer Halbwertszeit (HWZ = $\ln 2/k$) von 41 Minuten.

Die Ergebnisse stimmten mit den theoretisch für einen einfachen Diffusionsvorgang zu erwartenden Werten statistisch sehr gut überein ($B = 0,767$).

Der ermittelte Inulinraum des isolierten Rattendiaphragmas von 239 ml/kg Feuchtgewicht hat für gereizte wie ungereizte Muskeln den gleichen Betrag. Er entsprach den bereits in der Literatur mitgeteilten Befunden für dieses Präparat recht gut (CREESE, 1954; CREESE und NORTHOVER, 1961). Seine Größe wird als Extracellulärraum (ECR) den folgenden Berechnungen der intracellulären Ionenkonzentrationen zugrunde gelegt.

9. Berechnung der intracellulären Ionenkonzentrationen.

Der Elektrolytgehalt in der Muskelfaser wurde unter folgenden Annahmen berechnet:

1. Nach Erreichen des Verteilungsgleichgewichtes sei der Inulinraum ein repräsentatives Maß für den extracellulären Raum (ECR); Inulin würde also für die Dauer der Experimente in keiner Weise verändert und damit der Bestimmung entzogen,
2. der beim Trocknen auftretende Gewichtsverlust stimme mit dem Wassergehalt der Präparate überein (FG = Feuchtigkeitsgehalt),
3. der Anteil an Bindegewebe in dem Muskelstreifen sei zu vernachlässigen,
4. die Elektrolyte, die in der Inkubationslösung vorliegen, verteilen sich in gleicher Konzentration und Aktivität auch im ECR,

5. im Faserwasser seien die Ionen in freier Lösung vorhanden.

Der Fehler, den die Einführung dieser Annahmen mit sich bringt, kann nicht sehr groß sein, wie systematische Untersuchungen dieses Problems gezeigt haben (FISHER und YOUNG, 1961; CREESE und D'SILVA, 1962).

Die Konzentration einer Ionenart in der Zelle (C_i) kann dann aus der Gesamtmenge im Gewebe (C_f (mm/kg_f)), aus der Konzentration in der Außenlösung (C_a (mm/l)), dem ECR (ml/kg_f) und dem Wert des Feuchtigkeitsgehaltes (FG (ml/kg_f)) nach folgender Formel berechnet werden:

$$C_i = \frac{C_f - C_a (ECR/1000)}{FG - ECR} \cdot 1000 \text{ (mm/l Faserwasser)}$$

10. Berechnung der Faseroberfläche.

Eine Schätzung der Oberfläche der Fasern im Rattenzwerchfell ließ sich nach dem von KLAUS, LÜLLMANN und MUSCHOLL (1960) verwendeten Ansatz durchführen:

$$\text{Oberfläche} = \left(\frac{1}{S} - ECR \right) \frac{0}{V} \text{ (cm}^2\text{/kg}_f\text{)}$$

Bezogen auf 1 kg feuchten Gewebes ergab sich unter Benutzung des Wertes von 0,001055 kg/cm³ (spezifisches Gewicht s, CREESE, 1954), einer Größe des extracellulären Raumes von 239 cm³/kg_f (ECR, vgl. Inulinraum) und eines mittleren Verhältnisses von Faseroberfläche zu Faservolumen von 1140 cm⁻¹ ($\frac{0}{V}$, KLAUS, LÜLLMANN und MUSCHOLL, 1960) eine Oberfläche von ungefähr 800 000 cm².

11. Statistische Verfahren und Symbole.

Die Auswertung und Verarbeitung der Ergebnisse geschah mittels statistischer Standardverfahren (A.LINDER, 1951; 1953). Folgende Symbole wurden verwendet:

$\bar{x}$	= Mittelwert,
$s_{\bar{x}}$	= Standardabweichung des Mittelwertes,
N	= Anzahl der Messungen,
p	= "probability", Überschreitungswahrscheinlichkeit.
$p > 0,05$	= Die Wahrscheinlichkeit dafür, daß in einem Vergleich die Grundgesamtheiten in mehr als 5 % identisch sein können; kein gesicherter Unterschied,
$p < 0,05$	= wahrscheinlicher Unterschied,
$p < 0,01$	= gesicherter Unterschied,
$p < 0,001$	= gut gesicherter Unterschied,
B	= Bestimmtheitsmaß,
$r = \sqrt{B}$	= Korrelationskoeffizient,
b	= Regressionskoeffizient.

Bei der Wiederholung der Experimente wurde die Anordnung des "lateinischen Quadrates" (LINDER, 1953) verwendet. Auf diese Weise ließen sich systematische Fehler, die im Verlaufe der Zeit das Ergebnis der Einzelversuche beeinflussen könnten, statistisch ausschalten.

IV. ERGEBNISSE1. Das Verhalten von Natrium, Kalium und Chlorid im isolierten, nicht erregten Zwerchfell.

Isolierte Hemidiaphragmen, die bei 38°C in oxygenierter, äquibrierter Salzlösung in Ruhe 180 Minuten lang inkubiert wurden, nahmen in Abhängigkeit von der Zeit aus der Lösung Natrium- und Chlorionen auf, sie gaben dagegen Kalium ab (gestrichelte Linien in Abbildung 2; vergleiche Abbildung 3).

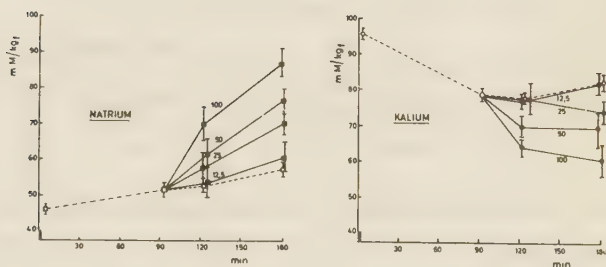


Abbildung 2: Mittelwerte des Natrium- und Kaliumgehaltes von isolierten, in oxygenierter KREBS-Lösung bei 38°C inkubierten Rattenzwerchfellen in Abhängigkeit von der Versuchsdauer und Reizfrequenz ($\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$; $N = 10$; gestrichelte Linien: nicht gereizte Präparate; ausgezogene Linien: gereizte Präparate; Reizfrequenz in Impulsen/min).

2. Veränderungen der Ionenkonzentrationen während Reizung mit verschiedenen Frequenzen.

Setzte nach 90 Minuten der Inaktivität die indirekte Reizung der Präparate ein, so kam es mit zunehmender Reizfrequenz zu einer deutlichen Verstärkung der Ionennettoverschiebungen, die Diaphragmen nahmen gegenüber den ungereizten Kontrollen vermehrt Natrium auf und verloren Kalium (ausgezogene Linien in Abbildung 2).

Die Änderungen im Kationengehalt waren dabei etwa gleich groß. Die begleitenden Variationen der Chloridkonzentration waren mit denen von Natrium positiv korreliert, erreichten aber nur ungefähr die Hälfte der Veränderungen des Natriumgehaltes (Abbildung 3).

Die Daten der mit 200 Impulsen/min gereizten Präparate deckten sich fast mit denen der Reizfrequenz von 100/min und wurden, um die Übersichtlichkeit der Abbildung nicht zu beeinträchtigen, weggelassen.

3. Korrelation der Innenkonzentrationen von Natrium, Kalium und Chlorid.

Die Mittelwerte der Innenkonzentrationen von Natrium, Kalium und Chlorid (Berechnung siehe Methodik) wurden für Gruppen von Diaphragmen nach Inkubationsdauer und Reizfrequenz getrennt berechnet ($N = 310$). Die statistische Bearbeitung des Zahlenmaterials führte zu folgenden Funktionen für die wechselseitige Abhängigkeit:

$$\begin{aligned} \text{Na}_i &= -1,07 \text{ K}_i + 203,1 & \text{B} &= 0,765 \\ \text{Cl}_i &= -0,58 \text{ K}_i + 121,5 \text{ (mM/l Faser-} & \text{B} &= 0,810 \\ \text{Cl}_i &= 0,47 \text{ Na}_i + 15,5 \text{ wasser)} & \text{B} &= 0,789 \end{aligned}$$

Alle einfachen Regressionsgleichungen ergaben eindeutige Beziehungen ($p < 0,01$).

Ähnlich enge Abhängigkeiten kamen in den Gleichungen der mehrfachen Regressionen zum Ausdruck:

$$\begin{aligned} \text{Cl}_i &= 99,4 + 0,11 \text{ Na}_i - 0,46 \text{ K}_i & \text{B} &= 0,813 \\ \text{K}_i &= 192,3 - 0,34 \text{ Na}_i - 0,86 \text{ Cl}_i \text{ (mM/l Fa-} & \text{B} &= 0,866 \\ \text{Na}_i &= 144,5 - 0,79 \text{ K}_i + 0,48 \text{ Cl}_i \text{ serwasser)} & \text{B} &= 0,779 \end{aligned}$$

Auch hier war die durch das Bestimmtheitsmaß B definierte Strenge der Korrelation statistisch zu sichern ($p < 0,01$).

Abbildung 3 veranschaulicht graphisch diese gegenseitigen Wechselwirkungen im intracellulären Gehalt von Natrium, Kalium und Chlorid.



Abbildung 3: Dreidimensionale Darstellung der korrelationsstatistischen Zusammenhänge zwischen den intracellulären Konzentrationen von Natrium, Kalium und Chlorid (mM/l Faserwasser). Mittelwerte der inaktiven und der gereizten Präparate, N=310. - Während die Ionenverschiebungen von Natrium und Kalium (y und x) im Verhältnis 1:1 erfolgen ($b=1,07$), bestehen zwischen Natrium und Chlorid (y und z), sowie zwischen Kalium und Chlorid (x und z) Austauschrelationen von etwa 2:1, wie sich aus den Regressionskoeffizienten von 0,47 bzw. 0,58 ergibt.

4. Nettoverschiebungen der Elektrolyte.

Die Differenz zwischen dem Gehalt an Natrium, Kalium und Chlorid im Gewebe der erregten Zwerchfellhälfte und der entsprechenden Konzentration im dazugehörigen, unerreizten Hemidiaphragma wurde für die definierten Reizfrequenzen ermittelt (Abbildung 4).

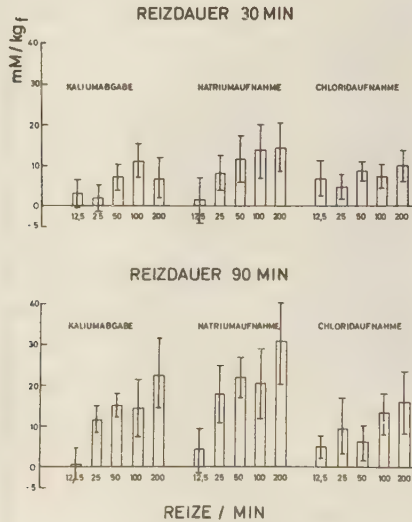


Abbildung 4: Nettotransporte (mM/kg_f) von Natrium, Kalium und Chlorid in erregten Präparaten im Vergleich zu den korrespondierenden, inaktiven Kontrollen. Der obere Teil der Abbildung enthält die Werte für 30 Minuten währende Reizung, der untere die für 90 Min. Die Säulen repräsentieren die Mittelwerte aus je 10 Versuchen für jede Frequenz (Impulse/min), die senkrechten Striche den mittleren Fehler des Mittelwertes ($\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$).

Zwischen Reizdauer und -frequenz auf der einen sowie den Nettotransporten auf der anderen Seite ergaben sich deutliche, aber keineswegs lineare Beziehungen. Die bemerkenswert große Streuung der Einzelwerte um den dazugehörigen Mittelwert jeder Gruppe war dadurch bedingt, daß in vielen Fällen, auch bei den höheren Frequenzen, Natrium zum Beispiel nicht aufgenommen, sondern abgegeben wurde.

5. Reizfrequenz und aktive Kationentransporte.

Der unterschiedliche Kationengehalt erregter und korrespondierender ruhender Hemidiaphragmen läßt sich darauf zurückführen, daß sich aktive und passive Transporte überlagern.

Bezeichnet man mit Na_{90+30} den Natriumgehalt der aktiven Hälfte nach 30 min Reizung, mit Na_{120} den der inaktiven Kontrolle zum gleichen Zeitpunkt, mit Na_E diejenige Menge an Natrium, die während der Erregung aufgenommen wurden und mit Na_T das aktiv aus der Faser eliminierte Natrium, so gilt unter Berücksichtigung der Zeit die folgende Beziehung:

$$Na_{90+30} - Na_{120} = Na_E - Na_T$$

Nach Na_T aufgelöst:

$$Na_T = Na_{120} + Na_E - Na_{90+30} \quad (\text{mM/kg}_f \cdot \text{min})$$

Nach dem gleichen Vorgehen läßt sich der Betrag des in der Muskelzelle reakkumulierten Kaliums (K_T) berechnen.

Unter der Annahme, daß pro Erregung und cm^2 der Membran 12 pM ($12 \cdot 10^{-12} \text{ M}$) Natrium in die Muskelzelle eindringen und 12 pM Kalium sie verlassen, ergaben sich für die Gewichtseinheit des Rattenzwerchfells bei einer geschätzten gesamten Faseroberfläche von $800\,000 \text{ cm}^2/\text{kg}_f$ (siehe Methodik) diese absoluten Werte: $9,6 \text{ } \mu\text{M Natrium}/\text{kg}_f \cdot \text{Impuls}$ (Aufnahme) und entsprechend $9,6 \text{ } \mu\text{M Kalium}/\text{kg}_f \cdot \text{Impuls}$ (Abgabe).

Aus diesen Daten resultierte dann der Betrag der während der Erregung aufgenommenen Natrium- und abgegebenen Kaliummenge (Na_E bzw. K_E) durch Multiplikation mit der Frequenz und Dauer der Stimulation. Diese Berechnungen wurden für jede Reizfrequenz durchgeführt (Abbildung 5).

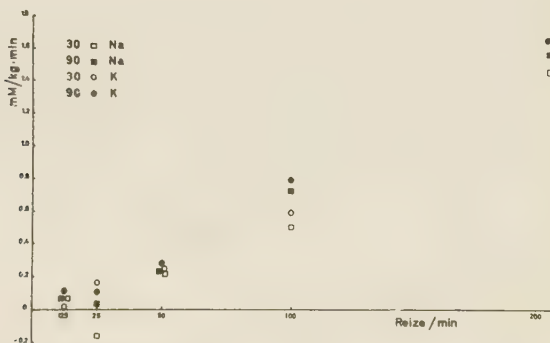


Abbildung 5: Transportraten ($\text{mM}/\text{kg}_f \cdot \text{min}$) für den Natrium-Efflux (Na_T) und den Kalium-Influx (K_T) in Abhängigkeit von der Reizfrequenz und der Reizdauer (30 min, 90 min). Jedes Symbol repräsentiert den Mittelwert aus 10 Versuchen.

Offenbar bestanden zwischen den Transportraten und der Reizfrequenz keine eindeutig linearen Beziehungen, obwohl die Zwerchfelle mit schnellerer Impulsfolge mehr Natrium verloren und Kalium aufnahmen. Die mit 12,5/min erregten Präparate mußten zum Beispiel etwa 0,06, die mit 200 Impulsen/min gereizten Diaphragmahälften aber ca. 1,6 mM Na⁺/kg_f in der Minute abgegeben haben. Einer Erhöhung der Reizfrequenz um das 16fache stand also in diesem Falle eine Zunahme der Transportrate um das 25fache gegenüber.

6. Der Einfluß der Innenkonzentrationen von Natrium und Kalium sowie der Reizfrequenz auf den Natriumnettotransport.

Die auffällig große Streuung der Mittelwerte aus zehn Versuchen für die Differenzen im Natriumgehalt zwischen gereizten und ruhenden Zwerchfellhälften (die senkrechten Striche in Abbildung 4) erklärte sich aus dem Umstand, daß in allen Gruppen auch Präparate vorhanden waren, die Natrium nicht aufgenommen, sondern im Gegenteil abgegeben haben. Dieses Verhalten wurde besonders deutlich, wenn nicht die Streuung der Mittelwerte, sondern die der Einzelwerte betrachtet wurde, die um mehr als das Dreifache größer war ($s = s_{\bar{x}} \cdot \sqrt{N}$).

Auf der Suche nach den Parametern, die das Ausmaß des Natriumtransportes bestimmen, mußten einmal der Konzentrationsgradient, gegen den Natrium aus der Faser eliminiert werden muß, und zum anderen die Größe des elektrischen Feldes, die eine Funktion des Kaliumgradienten an der Membran ist, Berücksichtigung finden (vergl. Fragestellung). Darüber hinaus ist wahrscheinlich der Frequenz der Reizung Bedeutung beizumessen.

Aus diesen Überlegungen heraus wurde eine statistische Analyse der Abhängigkeit des Natriumnettotransportes (y) vom Logarithmus der Innenkonzentrationen von Kalium und Natrium ($\log K_i = x_1$; $\log Na_i = x_2$) sowie der Reizfrequenz (x_3) durchgeführt (Tabelle 2 und 3).

In voller Übereinstimmung ergaben sich gesicherte Beziehungen zwischen der Rate des Natriumnettotransportes und den Elektrolytkonzentrationen in der Faser. Demgegenüber war der Einfluß der Reizfrequenz bei der kürzeren Reizdauer unbedeutend und nahm erst nach 90 Minuten wäherender Reizung etwas zu. Die Beurteilung der Korrelationskoeffizienten zeigte, daß eine Erhöhung der Transportgeschwindigkeit für Natrium dann eintrat, wenn die Kaliuminnenkonzentration im jeweiligen Präparat vermindert (negative Korrelation zwischen y und x_1), die Natriuminnenkonzentration aber angestiegen war (positive Korrelation zwischen y und x_2).

90 Minuten Ruhe + 30 Minuten Reizung (N = 52)

$y = - 94,13 x_1 + 195,06$	$B = 0,148$ ***
$y = 22,34 x_2 - 39,51$	$B = 0,246$ ***
$y = - 0,05 x_3 - 4,13$	$B = 0,038$
$y = - 15,74 x_1 + 8,81 x_2 + 13,41$	$B = 0,122$ **
$y = - 29,04 x_1 + 17,86 x_2 + 0,09 x_3 + 25,16$	$B = 0,314$ ***

90 Minuten Ruhe + 90 Minuten Reizung (N = 54)

$y = - 77,80 x_1 + 150,39$	$B = 0,222$ ***
$y = 48,64 x_2 - 95,21$	$B = 0,403$ ***
$y = - 0,10 x_3 - 11,35$	$B = 0,129$ *
$y = - 13,99 x_1 + 44,31 x_2 - 20,49$	$B = 0,411$ ***
$y = - 24,47 x_1 + 41,97 x_2 - 0,11 x_3 - 22,85$	$B = 0,278$ **

y = Natriumnetttransport (mM/kg_f)

$x_1 = \log K_i$ (mM/l Faserwasser)

$x_2 = \log Na_i$ (mM/l Faserwasser)

$x_3 = \text{Reizfrequenz}$ (Impulse/min)

*** = $p < 0,05$

** = $p < 0,01$

* = $p < 0,001$

Tabelle 2: Einfache und mehrfache Regressionsgleichungen für die Abhängigkeit des Natriumnetttransportes von der Natrium- und Kaliuminnenkonzentration und der Reizfrequenz für 30 bzw. 90 Minuten Reizdauer.

Partielle Regressionen	Korrelationskoeffizient "r"		Bestimmtheit "B"	
	90 + 30 (N = 52)	90 + 90 (N = 54)	90 + 30	90 + 90
$y \ x_1 : x_2$	- 0,124	- 0,082	0,015	0,007
$y \ x_1 : x_3$	- 0,513	- 0,550	0,263 ^{***}	0,303 ^{***}
$y \ x_2 : x_1$	+ 0,353	+ 0,516	0,125	0,267
$y \ x_2 : x_3$	+ 0,521	+ 0,723	0,272 ^{***}	0,523 ^{***}
$y \ x_3 : x_1$	- 0,244	- 0,470	0,060	0,220
$y \ x_3 : x_2$	- 0,266	- 0,551	0,071	0,304

y = Natriumnettotransport (mM/kg_f)
 x_1 = log K_1 (mM/l Faserwasser)
 x_2 = log Na_1 (mM/l Faserwasser)
 x_3 = Reizfrequenz (Impulse/min)

*** = $p < 0,001$

Tabelle 3: Werte für die Bestimmtheiten und Korrelationskoeffizienten der Teilregressionen für die den Natriumtransport beeinflussenden Faktoren.

(Nach variationsstatistischer Ausschaltung des Einflusses eines Parameters wurde die Abhängigkeit des Nettotransportes von den anderen bestimmenden Größen getrennt ermittelt. Dabei bedeutet z.B. $y \ x_1 : x_2$ die statistische Abhängigkeit der Größen y und x_1 nach Eliminierung des Einflusses von x_2).

7. Die quantitative Abhängigkeit des aktiven Natriumtransportes vom elektro-chemischen Potential.

Die im vorigen Abschnitt beschriebene reziproke Abhängigkeit der Größe des Natriumtransportes von der intracellulären Natrium- und Kaliumkonzentration wies auf einen energetischen Aspekt der Transportleistung der Zelle für Natriumionen hin, wie er im Begriffe des elektro-chemischen Potentials gegeben ist:

$$\frac{dG}{dn} = RT \ln \frac{Na_a}{Na_i} + RT \ln \frac{K_i}{K_a} \quad (\text{cal/mÄq})$$

Mit Hilfe dieses Ansatzes war es möglich, den Energieaufwand für die Verschiebung eines Milliäquivalentes Natrium aus dem Zellinnern in den interstitiellen Raum zu berechnen. Es resultierte eine statistisch sehr enge formale Beziehung zwischen der Intensität des Natriumtransportes gereizter Präparate und dem Logarithmus des elektro-chemischen Potentials, gegen das diese Ionenbewegungen erfolgten (Abbildung 6).

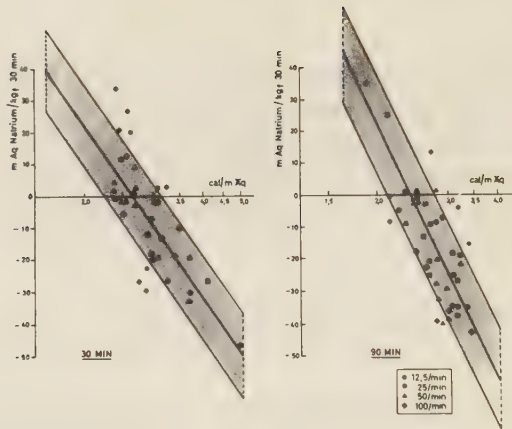


Abbildung 6: Abhängigkeit der Intensität des Natriumtransportes aktiver Präparate in m Äq/kg, 30 min vom Logarithmus des elektro-chemischen Potentials (cal/m Äq) der korrespondierenden inaktiven Kontrollen für die Reizdauer von 30 bzw. 90 Minuten und einer Impulsfolge von 12,5; 25; 50 und 100/min. Auf der Ordinate nach oben dargestellte Symbole zeigen einen nach auswärts gerichteten Natriumnetottransport, nach unten aufgetragene eine Natriumaufnahme der gereizten Zwerchfelhälften an.

Die in Abbildung 6 dargestellten Zusammenhänge basierten auf den folgenden Regressionsgleichungen:

30 min Reizung:

$$y = - 178,9 \cdot \log x + 76,3 \pm 12,7$$

$$(N=33; \quad r = - 0,719; \quad B = 0,517; \quad p < 0,001)$$

90 min Reizung:

$$y = -263,2 \cdot \log x + 102,4 \pm 15,3$$

$$(N = 40; \quad r = -0,692; \quad B = 0,478; \quad p < 0,001)$$

$$(y = \text{mÄq Natrium/kg}_f \cdot 30 \text{ min}; \quad x = \text{cal/mÄq})$$

Ein kritischer Wert des elektro-chemischen Potentials ergab sich nach 30 Minuten Reizung, wenn $\log x = 0,427$ ($x = 2,67 \text{ cal/mÄq}$) wurde, und nach 90 Minuten, wenn $\log x = 0,389$ ($x = 2,45 \text{ cal/mÄq}$) erreichte. Das bedeutete, daß die Hemidiaphragmen in der Regel bei einem geringeren elektro-chemischen Potential Natrium abgaben, bei einem höheren aber Natrium aufnahmen. Diese Beziehungen ließen sich statistisch eindeutig sichern.

Wurde bei diesen Kalkulationen die durch die Anzahl der Impulse definierte Menge an Natriumionen, die während der Reizung passiv von der Zelle aufgenommen worden war (Na_E , verg. Ergebnisse, Abschnitt 5) berücksichtigt, so führte das zu einer Veränderung des Wertes für das kritische elektro-chemische Potential (Abbildung 7).

Die Berechnung dieser Regressionsgleichungen ergab die folgenden Abhängigkeiten:

30 min Reizung:

$$y = -175,9 \cdot \log x + 84,8 \pm 12,8$$

$$(N = 38; \quad r = -0,756; \quad B = 0,572; \quad p < 0,001)$$

$$(y = \text{mÄq Natrium/kg}_f \cdot 30 \text{ min}; \quad x = \text{cal/mÄq})$$

90 min Reizung:

$$y = -405,1 \cdot \log x + 205,7 \pm 20,7$$

$$(N = 38; \quad r = -0,733; \quad B = 0,538; \quad p < 0,001)$$

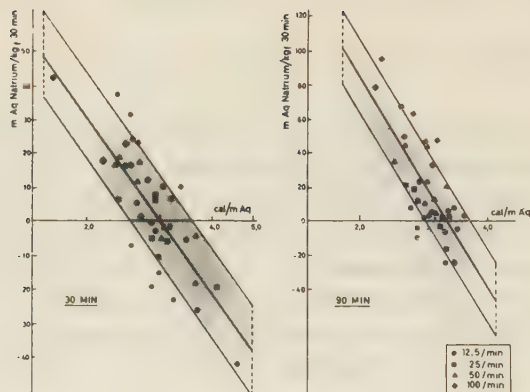


Abbildung 7: Abhängigkeit der Intensität des Natriumtransportes aktiver Präparate in $\text{mÄq/kg}_f \cdot 30 \text{ min}$ vom Logarithmus des elektro-chemischen Potentials (cal/mÄq) der korrespondierenden inaktiven Kontrollen für die Reizdauer von 30 bzw. 90 min und einer Impulsfolge von 12,5; 25; 50 und 100/min. Berücksichtigung der Menge von passiv während der Reizung aufgenommenem Natrium. Auf der Ordinate nach oben dargestellte Symbole zeigen einen nach auswärts gerichteten Natriumnettotransport, nach unten aufgetragene eine Natriumaufnahme der gereizten Zwerchfelhälfen an.

Die kritischen Werte für das elektro-chemische Potential, unterhalb deren Natrium in der Regel nach außen transportiert wurde, und oberhalb deren die Natriumkonzentration in den erregten Präparaten zunahm, lagen jetzt nach 30 min Reizung bei 3,04 und nach 90 min bei 3,22 cal/mÄq .

Der Vergleich der Ergebnisse von Abbildung 6 und Abbildung 7 zeigte neben der Zunahme der Transportraten auch eine Rechtsverschiebung des Schnittpunktes auf der Abszisse für diejenigen Zwerchfelle, bei denen eine Korrektur für das passiv in die Faser eingeströmte Natrium vorgenommen worden war. Die Verschiebung des kritischen elektro-chemischen Potentials war aber, bedingt durch die Streuung der einzelnen Daten um die Regressionsgeraden, statistisch nicht zu sichern.

V. D I S K U S S I O N

1. Das isolierte, inaktive Diaphragma.

Die in vivo bestehenden beträchtlichen Ionenungleichgewichte an der Membran werden innerhalb relativ enger Grenzen aufrechterhalten und sind eine wesentliche Voraussetzung für Erregbarkeit und Kontraktilität der Muskelzelle. Es ist deshalb von Interesse, diese Zusammenhänge unter definierten Versuchsbedingungen näher zu charakterisieren.

Das isolierte Zwerchfell der Ratte verliert in oxygenierter, äquilibrierter Elektrolytlösung Kalium und nimmt dafür Natrium auf, dabei gleichen sich die intra- und die extracellulären Konzentrationen dieser Ionen einander an. Die Ursachen dieser Ionenverschiebungen sind in einer Veränderung der selektiven Durchlässigkeit der Membran sowie in einer Störung der aktiven Transportfunktion der Zelle zu suchen (WESTPHAL, 1966).

In unseren Experimenten steht einer Kaliumabgabe von 12 mM/kg_f eine gleich große Natriumaufnahme gegenüber (vergl. Abbildung 2). Die nach drei Stunden erreichten Werte für den Natriumgehalt entsprechen den Daten von FLÜCKIGER und VERZÄR (1954), CREESE (1954), LÜLLMANN (1958), RIXON und STEVENSON (1958) und DEL MONTE (1961), liegen aber wesentlich unter denjenigen, die von AEBI (1953), BARNES und Mitarb. (1955) und KRNEJEVIĆ und MILEDI (1958) mitgeteilt worden sind.

2. Das isolierte, erregte Diaphragma.

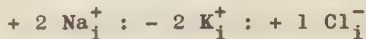
Durch niederfrequente Reizung (12/min) kann man in vorher ruhenden Zwerchfellen eine Intensivierung des aktiven Natriumtransportes erreichen (WESTPHAL, 1959). Bis jetzt war der Einfluß höherer Reizfrequenzen auf dieses Phänomen noch nicht untersucht.

Es ist zu erwarten, daß bei schnellerer Impulsfolge die Menge von passiv in die Faser einströmendem Natrium einen eventuell induzierten aktiven Natrium-Efflux überdeckt. Tatsächlich läßt sich zeigen, daß die nach 30 oder 90 Minuten dauernder Reizung im Zwerchfell vorhandenen Konzentrationen von Natrium und Kalium eine deutliche Abhängigkeit von der Frequenz haben (Abbildung 2; Abbildung 4). Die Präparate geben im Mittel mehr Kalium ab und nehmen mehr Natrium auf, wenn Frequenz und Dauer der Reizung zunehmen. Parallel zu den Veränderungen im Natriumgehalt verlaufen die für Chlorid (Abbildung 4).

Sowohl für ruhende als auch für erregte Hemidiaphragmen bestehen sehr enge quantitative Beziehungen zwischen den intracellulären Konzentrationen von Natrium, Kalium und Chlorid (s. Ergebnisse, Abschnitt 3, Abbildung 3). Die erhobenen Befunde legen die Annahme eines Austausches von Natrium gegen Kalium im Verhältnis 1 : 1 nahe. Die Ergebnisse zeigen gute Übereinstimmung mit denen, die von anderen Autoren (STEINBACH, 1947; CONWAY, 1957; RIXON und STEVENSON, 1958; HOCHREIN und NAGANO, 1963; KÜCHLER, NEUDEL und ZETT, 1963; KLEINZELLER und KNOTKOVÁ, 1964; KERNAN, 1965; DOCKRY, KERNAN und TANGNEY, 1966) erhalten worden sind.

Mit der Zunahme von Na_i und der Abnahme von K_i steigt die intracelluläre Chloridkonzentration an. Die berechnete

Abhängigkeit dieses Austausches steht in Einklang mit einer Relation von:



Da die Chlorionen im Faserwasser wahrscheinlich in freier Lösung vorliegen (KEYNES, 1963) bedeutet ein solcher Austauschmechanismus, daß sich mit der Chlorid- auch die intracelluläre Anionenkonzentration ändern muß, wenn die Elektroneutralität des Zellinhaltes gewahrt bleiben soll. Man muß dabei daran denken, daß Aminosäuren (ECKEL und SPERLAKIS, 1963) oder Phosphationen (DUBUISSON, 1954) eine besondere Bedeutung zukommen könnte. Auf jeden Fall zeigt das Resultat der Berechnung der Korrelation zwischen Natrium, Kalium und Chlorid, daß durch den Austausch dieser drei Ionen die Veränderungen im Elektrolytgehalt des Zwerchfells nicht vollständig beschrieben werden. Darüber hinaus läßt sich, im Gegensatz zu den Verhältnissen am Skelettmuskel des Frosches (BOYLE und CONWAY, 1941; ADRIAN, 1961), die Variation des Chloridgehaltes im Zwerchfell der Ratte nicht durch eine DONNAN-Verteilung erklären. Die aus der Beziehung

$$\text{Cl}_1 = \frac{\text{Cl}_a \cdot \text{K}_a}{\text{K}_1} \quad (\text{mM/l Faserwasser})$$

errechneten Werte für Cl_1 , machen nur etwa $23 \pm 8 \%$ der wirklich gemessenen aus.

Bei der quantitativen Analyse des durch Reizung mit verschiedenen Frequenzen induzierten Natriumtransportes (Abbildung 5) wurde ein Natriumeinstrom von 12 pM/cm^2 Membran . Impuls zugrunde gelegt.

Dieser Wert ist am Zwerchfell der Ratte nicht direkt bestimmt worden. Seine exakte Ermittlung mit markiertem Natrium ist aus methodischen Gründen schwierig, weil die normale intracelluläre Natriumkonzentration im Verhältnis zur extracellulären sehr niedrig ist, und weil ein Teil des gemessenen Fluxes auf "Austauschdiffusion" (USSING, 1947) zurückgeführt werden muß. Diese Schwierigkeiten sind für Fluxmessungen an der Einzelfaser wesentlich geringer. HODGKIN und HOROWICZ (1959) haben an der isolierten Muskelfaser aus dem M. semitendinosus des Frosches den die Erregung begleitenden Natriumeinstrom und Kaliumausstrom mit radioaktiven Isotopen direkt gemessen. Einer Nettoaufnahme von $15 + 2 \cdot 10^{-12}$ M Natrium steht demnach eine Nettoabgabe von $10 + 1 \cdot 10^{-12}$ M K/cm² · Impuls gegenüber. In der gleichen Größenordnung liegt aber der von CREESE, HASHISH und SCHOLES (1958) am isolierten Rattenzwerchfell ermittelte Wert für den Kalium-Efflux von 12 pM Kalium/cm² · Impuls, der bei Anwendung tetanisierend wirkender Reizfrequenzen gewonnen worden ist.

Selbst wenn die für den passiven Natrium-Influx verwendete Größe von 12 pM/cm² · Impuls nicht völlig den wirklichen Verhältnissen am Zwerchfell entsprechen sollte, so würden die mit seiner Hilfe berechneten Transportraten eher größer als kleiner sein müssen (HODGKIN und HOROWICZ, 1959; HAAS, GLITSCH und TRAUTWEIN, 1963).

Die Menge des in die Zelle aufgenommenen Natriums wird dann durch die Dauer und Frequenz der Reizung definiert. Die gefundene Differenz zwischen den zu erwartenden und den tatsächlich gemessenen Natriumkonzentrationen in gereizten Hemidiaphragmen kann nur durch eine Intensivierung des aktiven Natriumauswärtstransportes während der elektrischen Stimulierung erklärt werden (Abbildung 5). Die Abhängigkeit der Geschwindigkeit der Kationentransporte von der Reizfrequenz scheint exponentieller Art zu sein. Dieses Ergebnis stimmt mit Befunden von HODGKIN und KEYNES (1956), KEYNES und SWAN (1959) sowie von MULLINS und FRUMENTO (1963) überein, die ebenfalls dafür sprechen, daß der Natrium-Efflux

mit der Natriuminnenkonzentration stärker zunimmt als einer linearen Beziehung entspricht.

3. Aktiver Ionentransport und elektro-chemisches Potential.

CONWAY (1960) hat aus dem Resultat seiner Untersuchungen über den aktiven Natriumtransport von Froschmuskeln, die vorher mit Natrium beladen worden waren, den Begriff der kritischen Energiebarriere (critical energy barrier) abgeleitet. In diesen Experimenten wird der Natriumgehalt des *M. sartorius* durch Aufbewahren in kaliumfreier Lösung bei 4° C wesentlich erhöht. Bei Raumtemperatur sind die Präparate nur dann in der Lage, Natrium zu eliminieren, wenn durch die Versuchsbedingungen das elektro-chemische Potential, gegen das der Auswärts-transport erfolgen muß, unter einen kritischen Wert von ca. 2,0 cal/mÄq gesenkt worden war. Solche Bedingungen lassen sich dadurch herstellen, daß der Kaliumgehalt im Inkubationsmedium erhöht und der Natriumgehalt gleichzeitig erniedrigt wird. (s. Fragestellung, S.8)

Spätere Befunde (CONWAY, KERNAN und ZADUNAISKY, 1961) scheinen dieses Konzept zu bestätigen.

In der letzten Zeit ist es auch an Skelettmuskeln von Ratten gelungen, unter ähnlichen Voraussetzungen die kritische Schwelle des elektro-chemischen Potentials zu ermitteln (DOCKRY, KERNAN und TANGNEY, 1966). Ihr Wert wird für den innervierten *M. extensor digitorum longus* und *M. soleus* mit 2,56 und für denervierte Muskeln mit 2,22 cal/mÄq Natrium angegeben.

Diese Versuche haben eine Variation der externen Kalium- und Natriumkonzentration zur Grundlage und sind an inaktiven

Muskeln durchgeführt worden. Dagegen beruhen die Ergebnisse, die hier vorgelegt werden, darauf, daß die internen Ionenkonzentrationen während der Inkubation eine Veränderung erfahren und der aktive Ionentransport durch Reizung induziert wird. Hierbei leisten die sich kontrahierenden Diaphragmen während der Dauer des Experimentes Arbeit am isotonischen Hebel.

Trotz des unterschiedlichen methodischen Vorgehens und der Verwendung eines anderen Präparates zeigen die von uns bestimmten Werte des kritischen elektro-chemischen Potentials von 2,67 oder 2,45 cal/mÄq Natrium (vergl. Ergebnisse, Abschnitt 7, Abbildung 6, Seite 30) eine bemerkenswerte Kongruenz zu den von DOCKRY, KERNAN und TANGNEY (1966) mitgeteilten Resultaten.

Bei der Berechnung des Energiebedarfes für den aktiven Natriumtransport wird davon ausgegangen, daß das Membranruhepotential (E_m) identisch mit dem Kaliumgleichgewichtspotential (E_K) sei (Seite 8; DOCKRY, KERNAN und TANGNEY, 1966, Gleichung (3)). Diese Annahme impliziert einen Fehler, dessen Größe nur dann ermittelt werden kann, wenn E_m und E_K am gleichen Präparat gemessen werden. Für das inkubierte Rattenzwerchfell ergeben sich dabei Werte von E_m , die 80 % derjenigen von E_K betragen (WESTPHAL, 1966). Das bedeutet, daß der elektrische Term des elektro-chemischen Potentials von uns zu hoch angenommen wird. Eine entsprechende Korrektur würde dazu führen, daß die in den Abbildungen 6 und 7 dargestellten Schnittpunkte der Regressionsgeraden mit der Abszisse um maximal 0,35 cal/mÄq nach links verschoben werden.

Berücksichtigt man darüber hinaus die Tatsache, daß gereizte Diaphragmen neben dem bereits vorhandenen intracellu-

lären Natrium auch noch während der Erregung passiv aufgenommenes zusätzlich eliminieren (s. Ergebnisse, Abschnitt 5, Abb. 5, Seite 23), dann ergibt sich eine deutliche Erhöhung der Transportleistung (Abb. 7, Seite 32). Als Folge dieser Angleichung an die wirklichen Verhältnisse steigt der Betrag des kritischen elektro-chemischen Potentials auf 3,04 bzw. 3,22 cal/mÄq Natrium an. In der gleichen Größenordnung liegt der Energieaufwand für den Natriumtransport von inaktiven Präparaten nach 90 oder 180 min dauernder Inkubation (3,06 bzw. 2,81 cal/mÄq).

Es gelingt, eine befriedigende formale Beziehung zwischen der Rate des Natriumtransportes und der Höhe des elektro-chemischen Potentials herzustellen. Dennoch ist daran zu denken, daß der dem aktiven Natriumtransport zugrunde liegende Mechanismus ein enges Verhältnis zur Verwertung von ATP (FLECKENSTEIN, 1955) und der Aktivität der asymmetrischen Membran-ATPase (SKOU, 1957) aufweist. Es hat sich nämlich gezeigt, daß die Intensität der ATP-Spaltung durch diese "Transport-ATPase" in der gleichen Weise erhöht wird, wie der Betrag des elektro-chemischen Potentials abnimmt. Beide Faktoren werden in ihrer Wirksamkeit durch die Konzentrationsgradienten von Natrium und Kalium an der Membran qualitativ gleichsinnig beeinflußt (SKOU, 1964; BAKER, 1966; BAKER und CONNELLY, 1966). Bis jetzt ist aber noch ungeklärt, ob identische quantitative Relationen zwischen ihnen und dem aktiven Natriumtransport bestehen.

VI. ZUSAMMENFASSUNG

Es wurde am isolierten Zwerchfell der Ratte untersucht, in welcher Weise die Konzentrationen von Natrium, Kalium und Chlorid durch indirekte Reizung (Frequenz 12,5 bis 200/min; Dauer 30 bis 90 Minuten) beeinflusst werden.

1. Inaktive Präparate nahmen Natrium und Chlorid aus dem Inkubationsmedium auf und gaben Kalium ab.

2. Natrium- und Chloridaufnahme und Kaliumabgabe wurden durch die Reizung mit zunehmender Reizfrequenz und Reizdauer verstärkt.

3. Zwischen den intracellulären Konzentrationen von Natrium, Kalium und Chlorid bestanden statistische Beziehungen, die einen Austausch von $+ 2 \text{ Na}^+ : - 2 \text{ K}^+ : + 1 \text{ Cl}^-$ wahrscheinlich machten.

4. Natriumaufnahme und Natriumabgabe des einzelnen Präparates zeigten formal eine sichere Abhängigkeit vom elektro-chemischen Potential. Oberhalb eines kritischen Wertes nahmen die Muskeln in der Regel Natrium auf, darunter gaben sie Natrium ab. Der kritische Wert lag bei ca. 2,5 cal/mÄq Natrium.

5. Wurde eine Korrektur für das während der Reizung aufgenommene Natrium durchgeführt, dann verschob sich der kritische Wert des elektro-chemischen Potentials auf ca. 3,0 cal/mÄq Natrium.

Herrn Privatdozenten Dr. Wolfgang WESTPHAL möchte ich für die Anregung zu und das ständige Interesse an dieser Arbeit meinen herzlichen Dank aussprechen.

Herrn Professor Dr. Erich BAUEREISEN, Vorstand des Physiologischen Institutes der Universität Würzburg, bin ich zu besonderem Dank verpflichtet, da er in entgegenkommender Weise die Untersuchungen an seinem Institut ermöglicht und mit Interesse verfolgt hat.

Herrn Mechanikermeister Ph.KÖHLER, Herrn D.WEPPERT und Herrn C.REINHARD (Physiologisches Institut der Universität Würzburg) danke ich für die Hilfsbereitschaft bei der Lösung praktisch-technischer Fragen.

L I T E R A T U R

- ADRIAN, R.H.: Internal chloride concentration and chloride efflux of frog muscle. *J.Physiol.* 156, 623-632, 1961.
- AEBI, H.: Elektrolyt-Akkumulierung und Osmoregulation in Gewebeschnitten. *Helv.physiol.acta* 11, 96-121, 1953.
- BAKER, P.F.: Die Natriumpumpe. *Endeavour* 25, 166-173, 1966.
- BAKER, P.F. and C.M.CONNELLY: Some properties of the external activation site of the sodium pump in crab nerve. *J.Physiol.* 185, 270-297, 1966.
- BARNES, J.M., Janet I.DUFF and C.J.THRELFALL: The behaviour of mammalian striated muscle in the presence of 2:4 dinitrophenol. *J.Physiol.* 130, 585-600, 1955.
- BORN, G.V.R. and Edith BÜLBRING: The movement of potassium between smooth muscle and the surrounding fluid. *J.Physiol.* 131, 690-703, 1956.
- BOYLE, P.J. and E.J.CONWAY: Potassium accumulation in muscle and associated changes. *J.Physiol.* 100, 1-63, 1941.
- BÜLBRING, Edith: Observations on the isolated phrenic nerve diaphragm preparation of the rat. *Brit.J.Pharmacol.* 1, 38-61, 1946.
- CAREY, Mary C., E.J.CONWAY and R.P.KERNAN: Secretion of sodium ions by the frog's sartorius. *J.Physiol.* 148, 51-82, 1959.
- CONWAY, E.J.: Nature and significance of concentration relations of potassium and sodium ions in skeletal muscle. *Physiol.Rev.* 37, 84-132, 1957.

- CONWAY, E.J.: Critical energy barriers in the excretion of sodium. Nature (Lond.) 187, 394-396, 1960.
- CONWAY, E.J., M.G. HARRINGTON and M. MULLANEY: The nature of sodium exchanges in isolated frog sartorii. J. Physiol. 165, 246-265, 1963.
- CONWAY, E.J., R.P. KERNAN and J.A. ZADUNAIKY: The sodium pump in skeletal muscle in relation to energy barriers. J. Physiol. 155, 253-279, 1961.
- CREESE, R.: Measurement of cation fluxes in rat diaphragm. Proc. Roy. Soc. (Lond.), Ser. B., 142, 497-513, 1954.
- CREESE, R.: Sodium exchange in rat muscle. Nature (Lond.) 201, 505-506, 1964.
- CREESE, R. and J.D.D. SILVA: Interfibre fluid from guinea-pig muscle. J. Physiol. 162, 44-53, 1962.
- CREESE, R., S.E.E. HASHISH and N.W. SCHOLES: Potassium movements in contracting diaphragm muscle. J. Physiol. 143, 307-324, 1958.
- CREESE, R. and Jean NORTHOVER: Maintenance of isolated diaphragm with normal sodium content. J. Physiol. 155, 343-357, 1961.
- DEL MONTE, U.: Relations between active transport and metabolism in rat diaphragm in vitro. Biochem. biophys. acta 49, 431-440, 1961.
- DITTMER, Dorothy S.: (Editor) Biological Handbooks - Blood and other body fluids. P. 36, Washington 1961.
- DOCKRY, Margaret, R.P. KERNAN and Aileen TANGNEY: Active transport of sodium and potassium in mammalian skeletal muscle and its modification by nerve and by cholinergic and adrenergic agents. J. Physiol. 186, 187-200, 1966.
- DUBUISSON, M.: Muscular contraction. Springfield/Ill., 1954.
- ECKEL, R.E. and N. SPERLAKIS: Membrane potentials in K-deficient muscle. Am. J. Physiol. 205, 307-312, 1963.

- FENN, W.O. and D.M. COBB: The potassium equilibrium in muscle.
J.gen.Physiol. 17, 629-656, 1934.
- FISHER, R.B. and D.A.B. YOUNG: Direct determination of extra-cellular fluid in the rat heart.
J.Physiol. 158, 50-58, 1961.
- FLECKENSTEIN, A.: Der Kalium-Natrium-Austausch als Energieprinzip in Muskel und Nerv.
Berlin-Göttingen-Heidelberg, 1955.
- FLÜCKIGER, E. und F. VERZAR: Der Einfluß des Kohlenhydratstoffwechsels auf den Natrium- und Kalium-austausch des überlebenden Muskels.
Helv.physiol.acta 12, 50-56, 1954.
- GOURLEY, D.R.H.: Effect of insulin on potassium exchange in normal and ouabain treated skeletal muscle.
J.Pharmacol. 148, 339-347, 1965.
- HAAS, H.G., H.G. GLITSCH und W. TRAUTWEIN: Natrium-Fluxe am Vorhof des Froschherzens.
Pflüg.Arch.ges.Physiol. 277, 36-47, 1963.
- HOCHREIN, H. und M. NAGANO: Elektrolytkonzentrationen und Enzymaktivitäten im Myokard in Abhängigkeit von der Druckbelastung des Herzens.
Verh.Dtsch.Ges.Kreislauff., 28.Tagung, 1962, DARMSTADT, 1963, S.454-460.
- HODGKIN, A.L. and P. HOROWICZ: Movements of Na and K in single muscle fibres.
J.Physiol. 145, 405-432, 1959.
- HODGKIN, A.L. and A.F. HUXLEY: A quantitative description of membrane current and its application to conduction and excitation in nerve.
J.Physiol. 117, 500-544, 1952.
- HODGKIN, A.L. and R.D. KEYNES: Active transport of cations in giant axons from Sepia and Loligo.
J.Physiol. 128, 28-60, 1955.
- HODGKIN, A.L. and R.D. KEYNES: Experiments on the injection of substances into squid giant axons by means of a microsyringe.
J.Physiol. 131, 592-616, 1956.

- KERNAN, R.P.: Stimulation of active transport of sodium from sodium-rich frog muscle by insulin and lactate. Nature (Lond.) 190, 347, 1961.
- KERNAN, R.P.: Active transport in innervated and denervated mammalian skeletal muscle. J.Physiol. 179, 63P, 1965.
- KEYNES, R.D.: Chloride in the squid giant axon. J.Physiol. 169, 690-705, 1963.
- KEYNES, R.D. and R.C.SWAN: The effect of external sodium concentration on the sodium fluxes in frog skeletal muscle. J.Physiol. 147, 591-625, 1959.
- KLAUS, W., H.LÜLLMANN und E.MUSCHOLL: Der Kalium-Flux des normalen und denervierten Rattenzwerchfells. Pflüg.Arch.ges.Physiol. 271, 761-775, 1960.
- KLEINZELLER, A. and A.KNOTKOVÁ: Electrolyte transport in rat diaphragm. Physiol.Bohem. 13, 317-326, 1964.
- KLOTZ, I.M.: Grundlagen biochemischer Energetik. Stuttgart, 1960.
- KREBS, H.A. und K.HENSELEIT: Untersuchungen über die Harnstoffbildung im Tierkörper. Hoppe-Seyler's Zschr.physiol.Chem. 210, 33-66, 1932.
- KRNJEVIC, K. and R.MILEDI: Failure of neuromuscular propagation in rats. J.Physiol. 140, 440-461, 1958.
- KÜCHLER, G., J.NEUEDEL und L.ZETT: Einfluß des Sauerstoffs in verschiedenen Druckbereichen (0-10 at) auf Funktionsfähigkeit und Ionengehalt isolierter Froschskelettmuskeln. I.Mitt., Zeitgang von Funktionsfähigkeit und Ionengehalt an isolierten Skelettmuskeln von Sommer- und Winterfröschen unter 1 at Sauerstoff. Pflüg.Arch.ges.Physiol. 278, 383-394, 1963.
- LAMB, J.F.: The chloride content of rat auricle. J.Physiol. 157, 415-425, 1961.

- LINDER, A.: Statistische Methoden für Naturwissenschaftler, Mediziner und Ingenieure, 2.Aufl., Basel, 1951.
- LINDER, A.: Planen und Auswerten von Versuchen, eine Einführung für Naturwissenschaftler, Mediziner und Ingenieure. Basel, 1953.
- LÜLLMANN, H.: Über die Konstanz des Membranpotentials bei spontanen Änderungen der Ionengradienten am normalen und denervierten Rattenzwerchfell. Pflüg.Arch.ges.Physiol. 267, 188-199, 1958.
- MULLINS, L.J. and A.S.FRUMENTO: The concentration dependence of sodium efflux from muscle. J.gen.Physiol. 46, 629-654, 1963.
- NETTER, H.: Theoretische Biochemie. Physikalisch-chemische Grundlagen der Lebensvorgänge. Berlin-Göttingen-Heidelberg, 1959.
- NETTER, H.: Mögliche Mechanismen und Modelle für aktive Transportvorgänge. 12.Colloqu.Ges.physiol.Chem., Mosbach 1961, S.15-44, Berlin-Göttingen-Heidelberg, 1961.
- VERTON, E.: Beiträge zur allgemeinen Muskel- und Nervenphysiologie. II.MITTH: Ueber die Unenthbehrlichkeit von Natrium- (oder Lithium-) Ionen für den Contractionsact des Muskels. Arch.ges.Physiol. 92, 346-386, 1902.
- PAGE, E., R.J.GOERKE and S.R.STORM: Cat heart muscle in vitro. IV.Inhibition of transport in quiescent muscles. J.gen.Physiol. 47, 531-543, 1964.
- PARKS, Th.D. and L.LYKKEN: Potentiometric, amperometric and polarographic methods for microanalysis. Anal.Chem. 22, 1444-1446, 1950.
- RIXON, R.H. and J.A.F.STEVENSON: Movements of sodium, potassium and water in rat diaphragm in vitro. Am.J.Physiol. 194, 363-368, 1958.

- SKOU, J.C.: The influence of some cations on an adenosine triphosphatase from peripheral nerves. Biochem.biophys.acta 23, 394-401, 1957.
- SKOU, J.C.: Enzymatic aspects of active linked transport of Na^+ and K^+ through the cell membrane. Progr.Biophys.biophys.Chem. 14, 131-166, 1964.
- STEINBACH, H.B.: Sodium and potassium in frog muscle. J.biol.Chem. 133, 695-701, 1940.
- STEINBACH, H.B.: Intracellular inorganic ions and muscular action. Ann.New York Acad.Sci. 47, 849-874, 1947.
- STIER, A.: Zur Submikrobestimmung von organischen Chlorverbindungen. Zschr.analyt.Chem. 139, 195-198, 1963.
- USSING, H.H.: Interpretation of the exchange of radiosodium in isolated muscle. Nature (Lond.) 160, 262-263, 1947.
- USSING, H.H.: Experimental evidence and biological significance of active transport. 12.Coll.Ges.physiol.Chem., Mosbach, 1961, S.1-11, Berlin-Göttingen-Heidelberg, 1961.
- WAHLER, B.E.: Bestimmung von 2-20 μg Inulin in tierischen Geweben. Hoppe-Seyler's Zschr. physiol.Chem. 306, 84-89, 1956.
- WESTPHAL, W.: Änderungen der Ionenverteilung in der Muskulatur der nephrektomierten Ratte nach Entfernung der Nebennieren. Pflüg.Arch.ges.Physiol. 268, 43, 1958.
- WESTPHAL, W.: Der Einfluß der Nebennierenrinde und der Aktivität auf den Elektrolyttransport im isolierten Rattendiaphragma. Pflüg.Arch.ges.Physiol. 270, 67, 1959.
- WESTPHAL, W.: Der Einfluß indirekter Reizung auf den aktiven Natrium- und Kaliumtransport im isolierten Zwerchfell der Ratte. Pflüg.Arch.ges.Physiol. 274, 6, 1961.

WESTPHAL, W.:

Erregung und aktiver Kationentransport.
- Versuche am isolierten Zwerchfell
der Ratte.
Habil.Schr., Würzburg, 1966.

WHITTAM, R.:

A convenient micro-method for the
estimation of tissue-chloride.
J.Physiol. 128, 65P, 1955.

LEBENS LAUF

Als Sohn des Facharztes Dr. Franz Limbourg und Frau Käthe, geb. Schmidt, wurde ich am 6. April 1939 in Würzburg geboren.

Von 1946 bis 1949 besuchte ich in Würzburg die Volksschule, ab 1949 das Realgymnasium dieser Stadt, an dem ich 1958 die Reifeprüfung ablegte.

Im selben Jahr begann ich in Würzburg das Studium der Medizin und bestand 1959 die naturwissenschaftliche Vorprüfung. Nach Semestern in Göttingen, wo ich mich 1961 der ärztlichen Vorprüfung unterzog, setzte ich mein Studium in Würzburg fort und bestand dort am 23. Dezember 1965 das medizinische Staatsexamen.

Seit 1. April 1966 bin ich als Medizinalassistent tätig.

Ich versichere ehrenwörtlich, daß ich die vorliegende Arbeit selbständig verfaßt und außer der angegebenen Literatur keine weiteren Hilfsquellen benutzt habe.

Ich versichere ehrenwörtlich, daß ich bisher von keiner anderen Stelle ein Dissertationsthema zur endgültigen Bearbeitung erhalten habe.

Peter Limbourg

ROTADRUCK

Schmitt u. Meyer

Würzburg-Zell

Sudetenstr. 27 - Tel. 596895

ROTADRUCK

Schmitt u. Meyer

Würzburg-Zell

Sudetenstr. 27 - Tel. 596895